

УДК 577.156-616-006

© Дилакян, Цветкова

ЛИЗОСОМНЫЕ ЦИСТЕИНОВЫЕ ПРОТЕИНАЗЫ ПРИ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Э.А. Дилакян, И.В. Цветкова

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
119121 Москва, ул. Погодинская 10, тел. (095) 246-50-72
факс (095)245-08-57, эл.почта: Inna.Tsvetkova@ibmc.msk.ru

Суммированы данные, касающиеся классификации, свойств, структуры и биологических функций папаин-подобных лизосомных цистеиновых протеиназ (катепсинов) млекопитающих. Наиболее изучены катепсины В, Н, L, S и К. Обсуждаются особенности регуляции лизосомных цистеиновых протеиназ, в частности, регуляции специфическими эндогенными ингибиторами. Рассматривается участие этих ферментов в развитии физиологических и патологических процессов. Представлены данные относительно роли лизосомных цистеиновых протеиназ и их ингибиторов при неопластической трансформации. Обсуждается возможность использования эндогенных ингибиторов катепсинов как основы для создания противоопухолевых терапевтических средств.

Ключевые слова: лизосомные цистеиновые протеиназы, катепсины, эндогенные ингибиторы, неопластическая трансформация

ВВЕДЕНИЕ. Благодаря большому прогрессу в изучении протеиназ, достигнутому в 90-е годы, стало очевидным, что лизосомные цистеиновые протеиназы играют центральную роль в целом ряде важных клеточных процессов. Новые технологии позволили значительно расширить информацию относительно участия этих ферментов в патологических процессах, особенно в процессах неопластической трансформации, а также оценить роль регуляции деструктивного потенциала этих ферментов их специфическими ингибиторами. На основании гомологии последовательностей цистеиновые протеиназы суперсемейства папаина разделяют на несколько семейств, которые включают кальпаины, блеомицингидролазы, аспартил-специфические цистеиновые протеиназы – каспазы, и семейство папаин-подобных цистеиновых протеиназ [1]. К последнему семейству относят лизосомные цистеиновые протеиназы млекопитающих, названные катепсинами [2], которые широко распространены в клетках различных органов и тканей млекопитающих [3,4]. Новые методы исследования, в частности, методы молекулярной биологии позволили в последние годы идентифицировать и описать ряд новых катепсинов [4,5]. В настоящее время из 12 известных катепсинов человека достаточно полно охарактеризованы катепсины В, Н, L, S и К, которые отличаются по специфичности. Различия в специфичности ферментов обусловлены локальными различиями в субстрат-связывающей области [4,5]. В физиологических условиях различия в специфичности определяют как синергизм действия катепсинов при деградации белков, так и их особые

биологические функции. В последнее десятилетие было показано, что катепсины осуществляют не только деградацию белковых молекул. Оказалось, что эти ферменты являются регулируемыми протеиназами со специфическими функциями в физиологии клетки [4-7]. При этом функции катепсинов, имеющих ограниченную тканевую локализацию, могут быть более специализированными, как, например, функции катепсинов S и K [4-7]. Вследствие особенностей биологических функций лизосомные цистеиновые протеиназы вовлечены во многие физиологические и патологические процессы. Они участвуют в развитии различных патологических состояний и заболеваний, включающих ревматоидный артрит [8], остеопороз [9], мышечную дистрофию [10], болезнь Альцгеймера [11] и другие. Участие в таких процессах, как интенсивная деградация внутри- и внеклеточных белков, вовлечение в процесс презентации антигена и в апоптоз, изменение экспрессии активности и субклеточной локализации катепсинов, а также нарушение баланса протеиназа/эндогенный ингибитор, определяет включение лизосомных цистеиновых катепсинов на разных этапах многоступенчатого процесса канцерогенеза. Они включены в нарушение контроля роста и пролиферацию клеток, формирование трансформированного фенотипа раковых клеток, в их инвазивную активность и способность к миграции, процессы ангиогенеза. Активность цистеиновых лизосомных протеиназ в организме регулируется различными путями. Одним из наиболее важных факторов регуляции активности этих ферментов являются специфические эндогенные белковые ингибиторы цистеиновых протеиназ, которые относятся к суперсемейству цистатина [4-7]. В настоящее время эндогенные ингибиторы цистеиновых протеиназ интенсивно изучаются и предпринимаются попытки применения ингибиторов цистеиновых протеиназ как для коррекции процесса туморогенеза, так и для создания на их основе противоопухолевых средств. В обзоре будут рассмотрены последние данные о свойствах лизосомных цистеиновых протеиназ и их роли при неопластической трансформации, возможности использовать определение ферментов в клинике в качестве маркеров развития опухолевого процесса и эффективности лечения, а также данные об ингибиторах цистеиновых протеиназ как основы для создания антиканцерогенных препаратов.

1. Свойства лизосомных цистеиновых протеиназ.

1.1. Эволюция, классификация. К семейству папаин-подобных цистеиновых протеиназ относят папаин и родственные ему протеиназы растений (химопапаин, фицин, карикаин, бромелаин, актинидин и алеураин), а также лизосомные цистеиновые протеиназы млекопитающих – катепсины, которые составляют отдельное подсемейство [1,12]. Вероятно, это семейство возникло в эволюции эукариотов рано и, возможно, появилось до дивергенции эукариотов и прокариотов [13]. Обычно термин “катепсины” относят к внутриклеточным лизосомным протеиназам, хотя есть исключение (катепсин С – цитозольный фермент).

В настоящее время идентифицировано 12 катепсинов человека: В, L, S, K, O, C, H, V (L2), Z (X), F, W (лимфопаин) и легумаин, для которых определены аминокислотные последовательности и для некоторых из них - кристаллическая структура. Будучи папаин-подобными протеиназами, катепсины обладают сходными с папаином аминокислотными последовательностями и вторичной структурой. В зависимости от гомологии аминокислотных последовательностей катепсинов, их геномной организации, хромосомной локализации и присутствия особого, высококонсервативного аминокислотного мотива в области пропептида катепсины разделили на две подгруппы: катепсин-L-подобные протеиназы (L, V, K, S, H) и катепсин-B-подобные протеиназы [13,14]. Зрелые области ферментов обеих подгрупп имеют высокое сходство, тогда как прообласти демонстрируют очень небольшое сходство и значительно отличаются по длине. Прообласти катепсин-L-подобных протеиназ содержат ~ 100 остатков и значительно длиннее, чем пропептиды катепсин-B-подобных протеиназ (~ 60 остатков). Пропептиды

катепсин-L-подобных протеиназ содержат два высококонсервативных мотива, ERF/NIN-мотив и мотив GNFD [4,5]. Первый отсутствует у протеиназ подгруппы катепсина В (табл.) [5,14]. Катепсины С, О и Х, в пропептиде которых отсутствует мотив ERF/NIN, еще не классифицированы [15]. Кроме того, прообласть катепсина Х состоит только из 38 остатков и является наиболее короткой среди всех описанных катепсинов [16]. Полагают, что катепсин Х, возможно, принадлежит к подгруппе катепсин-В-подобных протеиназ, так как установлено определенное сходство в их третичных структурах [16]. Изучение эволюционного родства катепсинов F и W с другими катепсинами показало, что: (1) ген катепсина F (CTSF) подобен гену катепсина W (CTSW), но оба отличаются от генов катепсинов К, S, L, O, B и C; (2) ген катепсина F картирован в хромосоме 11 в положении q13.1-3, в локусе, одинаковом с локусом гена катепсина W; (3) прообласти катепсинов F и W содержат особый высококонсервативный белковый мотив “ERF/NAD” [14,15,17]. В настоящее время на основании приведенных данных катепсины F и W выделяют в отдельную подгруппу катепсин-F-подобных протеиназ наряду с подгруппами катепсин-L-подобных и катепсин-В-подобных протеиназ [14, 15].

Таблица. Лизосомные цистеиновые протеиназы человека: классификация и распространение.

Катепсины	Синонимы	Распространение	Хромосомная Локализация	Консервативный Мотив Пропептида
Катепсин-L-подобные		ERW/NIN и GNED		
L		Широкое Распространение	9q21	
V	L2, U	Эпителий тимуса, яичка, роговицы	9q21	
K	O, O2	Остеокласты, эпителий бронхов	1q21	
S		Антигенпредставляющие клетки	1q21	
H	Катепсин I	Широкое Распространение	15q24-25	
Катепсин-В-подобные		GNED		
B	B1	Широкое Распространение	8q22-23	
Катепсин-F-подобные				
F		Макрофаги	11q13.1-3	ERFNAQ
W	Лимфопаин	Лимфоциты	11q13	ERFNAQ
Катепсины неклассифицированные				
C	Дипептидилпептидаза I	Широкое Распрстранение	11q14	
O		Остеокласты	4q31-32	
X	Z	Широкое Распространение	20q13	
Легумаин		Активированные макрофаги, почки, селезенка		

1.2. Структура и механизм действия. Лизосомные цистеиновые катепсины активны в слабо кислой среде и являются мономерными, небольшими гомологичными белками с мол. массами ~ 20-35 кДа, которые имеют подобные аминокислотные последовательности и третичные структуры [рассмотрены в обзорах 4,12,17]. Исключение составляет катепсин С, который является олигомерным ферментом с мол. массой ~ 200 кДа [18]. Все катепсины являются гликопротеинами [4,5].

Цистеиновые катепсины состоят из двух доменов, названных L-(left) и R-(right) доменами. Основной чертой L-домена является центральная спираль, состоящая из 30 остатков, тогда как в основе R-домена располагается β -цилиндрический мотив [4]. Рентгеноструктурный анализ показал, что двудоменная структура открыта сверху, образуя V-образную щель активного центра, которая простирается по междоменной поверхности. Гомология последовательностей активного центра высокая, хотя вся аминокислотная гомология составляет только 20-60% [19]. Два каталитических остатка Cys25 и His159 (везде использована нумерация папаина), по одному от каждого домена, располагаются на дне V-образной щели активного центра. Каталитический Cys25, локализованный на N-конце центральной α -спирали, образует ионную пару с His159, расположенным в β -цилиндрическом домене на противоположной стороне щели активного центра [20]. Эта ионная пара, тиолат-имидазоль, необходима для каталитической активности. Отрицательно заряженный Cys25 имеет крайне низкое значение pKa в диапазоне между 2,5 и 3,5 [21].

Субстрат-связывающие участки катепсинов установлены на основании исследования кинетики и кристаллических структур ингибиторов, имитирующих субстрат, связанных с активными центрами ферментов. Использование субстратоподобных ингибиторов на основе реакционноспособной группы эпокисукцинила в комплексе с катепсином В [22,23] позволило получить информацию относительно субстрат-связывающих участков S1'- и S2' папаин-подобных протеиназ. Установлено, что субстрат связывается в протяженной конфигурации вдоль щели активного центра. Четко идентифицированными связывающими участками являются только S2, S1 и S1', при этом S2 и S1' представляют собой основные детерминанты специфичности. Описаны также добавочные субстрат-связывающие области (S4, S3, S2' и S3') [22,23].

Большинство из катепсинов (катепсины L, S и ряд других) являются эндопептидазами. Катепсин В помимо эндопептидазной активности проявляет карбоксидипептидазную активность [5,24]. Катепсин Х является карбокси-моно- и дипептидазой [25], а катепсин Н является аминопептидазой, хотя проявляет также и эндопептидазную активность [5,24]. У экзопептидаз доступ к субстрат-связывающему участку ограничен дополнительными структурами: "преграждающими" петлями в катепсинах В [26] и Х [25] или пептидными участками в аминопептидазах – катепсине Н [27] и катепсине С [6].

2. Регуляция.

Регуляция лизосомных цистеиновых протеиназ осуществляется на разных уровнях: транскрипции, трансляции, посттрансляционного процессинга, а также на уровне регуляции активности самого фермента. На посттрансляционном уровне активность лизосомных катепсинов контролируется различными путями, из которых наиболее важными считают активацию зимогена, изменение pH и ингибирование эндогенными белковыми ингибиторами [5,28].

2. 1. *Активация зимогена.* Подобно большинству других протеаз лизосомные цистеиновые протеиназы синтезируются в виде препробелков. После синтеза сигнальные препептиды удаляются во время прохождения молекул через просвет эндоплазматического ретикулума, где происходят дополнительные посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование и образование дисульфидных связей. Остатки маннозы в боковых цепях олигосахаридов фосфорилируются в аппарате Гольджи с образованием маннозо-6-фосфата, что делает возможным связывание профермента с маннозо-6-фосфатными рецепторами, локализованными на мембранах аппарата Гольджи [24]. Комплексы рецептор-профермент направляются в лизосомы, где вследствие низких значений pH рецептор диссоциирует от профермента. В кислой среде поздних эндосом или лизосом прокатепсины подвергаются протеолитическому процессингу с образованием зрелой активной формы фермента [29,30]. Пропептид, часть которого или он весь удаляется во время активации, отвечает за направленный

транспорт ферментов [31], надлежащий фолдинг и их стабильность [32]. Кроме того, N-концевой пропептид, который удаляется на этой стадии созревания фермента, *in vitro* специфически ингибирует активность зрелых катепсинов [33,34]. *In vitro* протеолитическое удаление пропептида осуществляется в результате действия различных протеиназ, таких как пепсин, эластаза нейтрофилов, катепсин D и различные цистеиновые протеиназы [34,35]. Кроме того, удаление пропептида может происходить в результате автокаталитического процессинга при кислом значении pH. Автокаталитическая активация представляет собой бимолекулярный процесс, в котором одна из молекул катепсина активирует другую по типу цепной реакции [5]. Полагали, что процесс включает механизм внутримолекулярного взаимодействия [35]. Однако анализ кристаллических структур прокатепсинов B, L и K [36-38] указывает на различный механизм активации этих проферментов, который обсуждается [36]. Исследования кристаллической структуры прокатепсина B показали, что пропептид проходит через щель активного центра с ориентацией, противоположной таковой субстрата, блокируя доступ к уже сформированному активному центру [28,37]. Пропептид, который *in vitro* является ингибитором, может быть, по крайней мере частично, удален из активного центра, что объясняет каталитическую активность предшественника. Активации может способствовать падение pH и/или присутствие гликозаминогликанов [5]. Однако только эндопептидазы могут подвергаться автокатализу, тогда как истинные экзопептидазы, катепсины X и C, требуют для их активации участия эндопептидаз, таких как катепсины L и S [39,40].

2.2. Изменение pH. Большинство цистеиновых лизосомных протеиназ (катепсины L, B, H, K, V и F) относительно нестабильны при нейтральных значениях pH, что, как полагают, является одним из регуляторных механизмов для этих ферментов. Однако оказалось, что другие катепсины (катепсин S, круципаин) достаточно стабильны в нейтральной среде, что возможно объясняет их роль в некоторых процессах вне лизосом [41-44].

При созревании лизосом pH снижается и часто достигает низких значений (3,8) [5], при которых может происходить необратимая денатурация катепсинов B, S и L [45]. Кроме того, при низком pH все лиганды, включая субстрат, ингибиторы и пропептид, слабо связываются с лизосомными катепсинами [33,45]; возможно, это обуславливается тем, что при созревании лизосом ферменты могут быть частично денатурированными. Денатурированный катепсин L деградируется катепсином D, который высокоактивен в кислой среде [45]. На этом основании высказано предположение, что pH-индуцированная инактивация с последующей протеолитической деградацией может быть более общим процессом, универсальным для всех лизосомных цистеиновых протеиназ.

Следует отметить, что вышеприведенные факторы осуществляют контроль активности протеиназ в лизосомах.

Функция рассматриваемых ниже ингибиторов протеиназ заключается в ингибировании в цитозольном и внеклеточном пространстве активных катепсинов, которые покинули лизосомы и эндосомы.

2.3. Эндогенные ингибиторы. Основным фактором регуляции зрелых активных лизосомных цистеиновых протеиназ являются их эндогенные белковые ингибиторы, к которым относятся цистатины [12,46], тиропины [47] и другие, а также универсальный ингибитор протеиназ – α_2 -макроглобулин [48].

Ингибиторы суперсемейства цистатинов включают стефины, цистатины и кининогены [12,46]. Цистатины не являются высокоизбирательными ингибиторами. Они ингибируют эндопептидазы в пиколярной области, а экзопептидазы в наномлярной области [12,49]. Стефины являются внутриклеточными ингибиторами, тогда как цистатины и кининогены – внеклеточными [46]. Рентгеноструктурный анализ показал, что в структуре цистатина N-концевой стволовой участок и две консервативные области (так называемые шпильки) петли цистатина вовлечены во взаимодействие с

консервативными участками активного центра фермента. При этом каталитический остаток Cys25 катепсина оказывается окруженным остатками ствола и первой шпильки петли цистатина [49].

Еще одну группу наиболее важных ингибиторов цистеиновых протеиназ составляют тиропины. Тиропины являются более избирательными ингибиторами, чем цистатины [47,50,51], что, вероятно, отражает их более специализированную роль *in vivo*. Эти ингибиторы гомологичны доменам тиреоглобулина I типа [47]. Среди них единственный известный ингибитор млекопитающих представляет собой фрагмент инвариантной цепи тиреоглобулина, р-41, ассоциированный с главным комплексом гистосовместимости (МНС) класса II, который является избирательным ингибитором катепсина L [50,51].

Мощной ингибиторной активностью в отношении цистеиновых протеиназ обладают два представителя ингибиторов семейства серпинов (семейство ингибиторов сериновых протеиназ). Этими ингибиторами являются антиген 1 плоскоклеточного рака (SSCA), который идентифицирован также как маркер опухолевых клеток плоскоклеточного рака [52,53], и цитотоксический антиген 2 β Т-лимфоцитов [54]. SSCA имеет большую гомологию с ингибитором активатора плазминогена типа II (PAI-II-подобный) и ингибирует цистеиновые протеиназы (катепсин L) по типу типичного серпинового механизма [55,56]. Установлено, что SSCA является высокоаффинным ингибитором не только для катепсина L, но также для катепсинов S и K и самого папаина. Второй серпиновый ингибитор - цитотоксический антиген 2 β Т-лимфоцитов, является гомологом пропептида катепсина L и, возможно, действует таким же образом, как пропептид [54].

3. Физиологическая роль.

Большинство катепсинов (B, L, H, F, X и др.) имеет универсальное распространение в различных органах и тканях живых организмов. Однако ряд катепсинов имеет более ограниченную тканевую локализацию. Так, катепсин S описывают как моноцит/макрофаг-специфическую протеазу [57]. Катепсин K избирательно экспрессируется в остеокластах [58], а катепсин W - преимущественно в лимфоцитах (лимфопаин) [59]. Катепсин V также проявляет тканевую специфичность и экспрессируется в тимусе и яичках [60,61]. Внутрилизосомная концентрация катепсинов достаточно высокая и может достигать 1 мМ [62].

Вследствие высокой лизосомной концентрации и особенности экспрессии различных цистеиновых протеиназ длительное время считали, что основная функция катепсинов заключается в неизбирательной деградации белков в лизосомах. При этом исследования, проведенные методом "генного нокаута" на мышах, лишенных гена той или иной протеиназы, позволили заключить, что внутрилизосомная белковая деградация не зависит исключительно от какого-то отдельного катепсина. Эксперименты на таких животных показали, что у них не наблюдается нарушений деградации белка [9,63-65].

С другой стороны, использование модельных систем генного нокаута позволило установить, что лизосомные катепсины имеют специфические и индивидуальные функции, которые очень важны для нормального функционирования организма. Эти специфические функции часто связаны с ограниченной тканевой локализацией катепсинов. Это показано для катепсинов S, V и K. Хотя катепсины B, H, L, F, C, X и O имеют широкое распространение, они также вовлечены в специализированные функции. Показано, что катепсин K важен для нормального ремоделирования костей [17], а у мышей с генетическим отсутствием катепсина K развиваются симптомы, наблюдаемые у больных с пикнодизостозом [9,66]. Подобные исследования, проведенные на мышах с дефицитом гена катепсина L, позволили выявить участие этого катепсина в процессах эпидермального гомеостаза и в регуляции морфогенеза волосных фолликул [67].

В последние годы получены новые данные, подтверждающие, что лизосомные катепсины, помимо их роли внутри лизосом, осуществляют

деградацию белков вне лизосом и вне клетки; они способны разрушать компоненты базальных мембран и внеклеточного матрикса (ВКМ) [4,68,69] и являются чрезвычайно важными ферментами процессинга. У мышей с дефицитом гена катепсина С нарушается активация ряда сериновых протеиназ гранулоцитов: гранзимов А и В, катепсина G, эластазы нейтрофилов и химазы [70]. Кроме того, катепсины осуществляют процессинг различных пробелков и прогормонов таких, как например проренин [71], тиреоглобулин [72,73] и, как полагают, вовлечены в образование эндостатина во время ангиогенеза [74].

Участие лизосомных цистеиновых протеиназ в презентации антигенов МНС класса II является важной функцией этих ферментов. Катепсины вовлечены в две важные стадии - осуществление процессинга инвариантной цепи (Ii), ассоциированной с МНС класса II, и в образование антигенных пептидов (пептиды длиной 13-26 аминокислотных остатков) [17]. Полагают, что за процессинг инвариантной цепи ответственен, главным образом, катепсин S, и, в меньшей степени, катепсин L [64,65,75]. Следует отметить, что катепсин S является главной цистеиновой протеиназой, присутствующей в большинстве из основных антигенпредставляющих клеток, таких как дендритные клетки, макрофаги и В-клетки [65,76-80]. Перечень катепсинов, участвующих в процессинге инвариантной цепи и презентации антигена класса II, не ограничивается названными протеиназами. Полагают, что катепсин F может играть важную роль в этом процессе в макрофагах [80]. Кроме того, вероятно, что катепсин V, наряду с катепсином L или вместо него, участвует в процессе презентации антигена [61].

В последние годы установлено участие катепсинов в процессе апоптоза – запрограммированной гибели клеток, хотя механизм этого участия до конца неясен [5]. Апоптоз играет важную роль во время эмбриогенеза, метаморфоза и нормального клеточного цикла. Апоптоз является основным механизмом, с помощью которого многоклеточные организмы удаляют излишние, инфицированные, поврежденные или злокачественные клетки, а также осуществляет селекцию Т- и В-лимфоцитов. Апоптоз может запускать целый ряд физиологических и патологических процессов и осуществляется через активацию собственной клеточной суицидной программы [81]. Рассмотрение апоптоза выходит за пределы настоящего обзора, в связи с чем мы коснемся лишь участия в этом процессе лизосомных катепсинов. Высвобождение лизосомных катепсинов в цитоплазму при разрушении лизосомной мембраны может приводить к стимуляции апоптоза в результате протеолитической активации прокаспазы-3 [82-84]. Этот механизм осуществляется через протеолитический каскад, в который вовлечен катепсин L [85,86]. Полагают, что лизосомные цистеиновые протеиназы вовлечены в апоптоз нейронов [87]. Косвенное доказательство этого получено в экспериментах на мышах с дефицитом стефина В [88]. Недостаточность стефина В, ответственного за врожденную форму миоклональной эпилепсии, приводит к апоптозу клеток мозжечка у стефин-В-дефицитных мышей [88]. Так как стефин В не ингибирует каспазы (главные ферменты апоптоза), а ингибирует лизосомные цистеиновые протеиназы, можно предположить, что эти ферменты вовлечены в апоптоз. Кроме того, показано, что катепсин С активирует сериновую протеазу – гранзим В цитотоксических Т-клеток [70,89] и, таким образом, опосредованно активирует каспазы [70]. Недавно было показано, что другие лизосомные цистеиновые протеиназы, в частности катепсин В, непосредственно активируют каспазы неизвестным пока механизмом [85,90-92].

4. Лизосомные цистеиновые протеиназы и канцерогенез.

Канцерогенез представляет собой сложный многоступенчатый процесс генетических и эпигенетических событий [93]. Протеиназы разных классов (аспартильные протеиназы – катепсин D, сериновые протеиназы – активатор плазминогена урокиназного типа (уАП), и различные металлопротеиназы) и в том числе лизосомные цистеиновые протеиназы участвуют на разных стадиях процесса канцерогенеза. Кроме того, они вовлечены в сложную цепь

взаимоотношений раковой клетки с близлежащими нормальными тканями и различными регуляторными и защитными системами организма хозяина [7,94-97].

4.1. Цистеиновые протеиназы на отдельных стадиях канцерогенеза.

В последние годы получены данные, свидетельствующие об участии катепсинов В, Н, L, S и К в неопластической трансформации нормальных клеток, дерегуляции пролиферации, а также в диссеминации опухолевых клеток – инвазии, метастазировании и ангиогенезе [4,5,7,17,94,97].

Как уже упоминалось выше, регуляция лизосомных цистеиновых протеиназ в клетке осуществляется на разных уровнях от транскрипции/трансляции, посттрансляционных модификаций и процессинга (активации) до направленного транспорта и секреции [94,98,99]. Изменения на одном или нескольких уровнях регуляции могут быть ответственными за увеличенную экспрессию мРНК, белка и активности, а также за изменение локализации, повышенную секрецию и связывание этих ферментов с рецепторами на поверхности клетки, что было многократно показано на злокачественных опухолях различного гистогенеза и клеточных линиях [94,99].

Так показано, что в трансформированных ретровирусами фибробластах мыши NIH 3T3 (KNIH) синтез прокатепсина L (MEP) в 25 раз выше, чем в нетрансформированных клетках, а секреция этого профермента составляет 94%, тогда как в норме не более 10% [100]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что увеличение уровня экспрессии активности катепсинов В и L зависит от типа трансформирующего агента: трансформация фибробластов крысы онкогеном *c-Ha-ras* приводит к значительному увеличению активности этих протеиназ, тогда как трансформация геном E7 вируса папилломы человека тип 16 не вызывает повышения активности катепсинов В и L [101]. В то же время, обнаруженное исследователями увеличение активности указанных катепсинов при иммортализации (трансфекция ДНК аденовируса SA7 и LT-гена вируса полиомы) не зависит от типа трансформирующего агента [101]. С другой стороны, на модельной системе эпителиальных клеток молочной железы человека MCF-10 установлено, что уровни транскриптов мРНК катепсина В в нормальных MCF-10M-, иммортализованных MCF-10A- или MCF-10F- и трансфицированных MCF-10AneoN- и MCF-AneoF-клетках одинаковые [102]. При этом на подобной системе эпителиальных клеток молочной железы человека MCF-10 показано, что происходит изменение направленного транспорта катепсина В, транслокация везикул, содержащих катепсина В и D, к периферии клетки, что может иметь функциональное значение для опухолевой прогрессии [99,103,104]. Имеющиеся данные пока не позволяют точно сказать, какие факторы (онкогены) и на каком этапе определяют вовлечение катепсинов в многоступенчатый процесс канцерогенеза.

При трансформации катепсины В и L секретируются в виде зрелых форм или как проформы, обе из которых активны [105,106]. Так как маннозо-фосфатные рецепторы являются главными рецепторами, ответственными за направленный транспорт и попадание в мишень лизосомных ферментов [107], первоначально предполагали, что изменения в этом механизме являются главной причиной повышенной секреции катепсинов. Однако кроме этого механизма были обнаружены другие связывающие прокатепсины рецепторы, что свидетельствует о существовании маннозо-6-фосфат-независимого пути в секреции катепсинов [105,107]. Такое связывание может существенно стабилизировать катепсин В, который в других случаях проявляет нестабильность, свойственную ферменту в норме [8,108]. Это, вероятно, объясняет наличие мембрано-связанного катепсина В, обнаруживаемого в некоторых опухолях [102,106,108]. Получены также доказательства того, что, помимо ранее описанных систем направленного транспорта, эндо- и экзоцитоз катепсина В может регулироваться белком *gas* и родственными ему белками [99]. Показано, что существует несколько типов популяций лизосом и что направленный транспорт в различные популяции может определять, будет ли секретироваться катепсин В из опухолевых клеток или

останется внутриклеточным [99]. Другим возможным механизмом повышенной секреции катепсина является альтернативный сплайсинг, который описан для катепсинов В и L [109,110]. Молекулы мРНК катепсина В, утратившие экзоны 2 и/или 3, обнаружены как главные формы в ряде опухолей. Эти делеции приводят к повышенной трансляции, которая может быть в 8 раз выше, чем при полноразмерной мРНК [109]. Продукт трансляции функционально активен, но лишен части прообласти, что объясняет увеличенный размер и стабильность таких секреторируемых форм [111]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что ассоциация с мембраной и секреция катепсинов не являются случайными процессами в опухолевых клетках, а представляют собой скорее часть четко контролируемой системы.

4.2. Цистеиновые протеиназы в прогрессии опухолей. Многочисленные данные позволяют считать, что увеличенная продукция и внеклеточное высвобождение лизосомных цистеиновых протеиназ, особенно катепсинов В и L, стимулируют опухолевый рост, процесс инвазии и метастазирование опухолевых клеток [99,112,113]. При этом активация экспрессии (повышенная экспрессия мРНК, белка и активности) и измененная локализация (ассоциация с мембраной и секреция) катепсинов В и L положительно коррелируют с инвазивной и метастатической способностью разных типов опухолевых клеток [94,112]. Показано, что катепсины В, Н и L вовлечены в раковую прогрессию, выполняя двоякую функцию. С одной стороны, они осуществляют прямое протеолитическое действие при контакте областей опухолевых клеток с базальными мембранами или интерстициальной стромой. В этих участках, которые часто “закисляются” опухолевыми клетками [114], активные формы катепсинов В и L или их секретированные формы или формы, образованные из секретированных предшественников [115-117], осуществляют деградацию белковых компонентов базальной мембраны и интерстициальной стромы, включающих ламинин, фибронектин, эластин и разные типы коллагена [70,75,118].

С другой стороны, лизосомные цистеиновые протеиназы осуществляют регуляторную функцию, активируя протеиназы других типов, такие как уАП [119,120], интерстициальную коллагеназу (про-ММР-1) [121] простромелизин-1 (про-ММР-3) [122], что впоследствии приводит к запуску протеолитического пути плазмин/матриксины [122].

Катепсин В также может непосредственно расщеплять и инактивировать ингибиторы матриксинов TIMP-1 и TIMP-2 [123]. Следовательно, катепсины В и L способствуют отделению опухолевых клеток от ВКМ, который ограничивает их продвижение и пролиферацию в тканях. Более того, во время протеолитического разрушения ВКМ могут освобождаться некоторые связанные с ВКМ ростовые факторы (например, bFGF, EGF, TGF, IGF-1 и VEGF) и становиться биодоступными для модуляции роста опухолевых и стромальных клеток, экспрессирующих рецепторы [124].

Полагают, что в результате протеолитической инактивации ингибиторов ангиогенеза TIMP-1 и TIMP-2 цистеиновые протеиназы, в частности, катепсин В, стимулируют ангиогенез; связанный с внешней поверхностью опухолевых клеток катепсин В может способствовать неоваскуляризации опухоли. С другой стороны, ассоциированный с внешней поверхностью опухолевой клетки катепсин L может действовать как антиангиогенный фактор, так как он освобождает из коллагена XVIII С-концевой полипептидный фрагмент эндостатин [75], который индуцирует задержку роста и апоптоз в эндотелиальных клетках [125]. Антагонистические эффекты катепсина В и катепсина L на рост эндотелиальных клеток предполагают, что эти ферменты, ассоциированные с внешней поверхностью опухолевых клеток, совместно участвуют в инициации гематогенного распространения опухолевых клеток. Во время этого патологического процесса катепсин В может способствовать вращанию капилляров в опухолевые узлы, в то время как катепсин L может промотировать интраваскцию опухолевых клеток через эндостатин-индуцированный апоптоз эндотелиальных клеток в стенке капилляров [125].

Катепсины В и L не являются единственными цистеиновыми катепсинами, стимулирующими инвазивный рост и диссеминацию опухолей. Катепсин К - секретлируемая лизосомная цистеиновая протеиназа, которая имеет автоактивируемый предшественник и проявляет сильную коллагенолитическую и эластинолитическую активность [126,127], также участвует в деградации ВКМ в некоторых типах опухолей. Увеличенная экспрессия катепсина К недавно была показана в опухолевых клетках карциномы молочной железы и легких [128,129].

Различные типы нормальных и опухолевых клеток эпителиального и неэпителиального происхождения могут погибать в результате апоптоза [130,131]. Апоптоз клеток, которые утратили контакты интегрин-ВКМ (аноикис, индуцированный отделением апоптоз), предотвращает распространение таких клеток в другие участки [130,131]. Возможно, что в инвазивно растущих опухолях значительная фракция опухолевых клеток может погибать через аноикис при протеолитической деградации ВКМ. В этом случае, осуществляемый цистеиновыми катепсинами протеолиз ВКМ во время роста опухоли может представлять собой обратную селекцию, которая стимулирует развитие и накопление вариантов опухолевых клеток, резистентных к аноикису [130,131]. Предполагают, что катепсин L играет определенную роль в протеолитических каскадах, связанных с апоптозом. В опытах на линии клеток глиомы человека, устойчиво трансфицированных антисмысловой и смысловой кДНК катепсина L, было показано, что торможение катепсина L антисмысловой кДНК значительно ограничивает (до 70%) инвазию клеток глиомы *in vitro* и увеличивает апоптоз клеток глиомы, индуцированный стауроспорином. Этот факт связывают с более ранней индукцией каспазы-3 [132]. В то же время активация катепсина L смысловой кДНК сопровождается снижением апоптоза и более поздней индукцией активности каспазы-3. Одновременно было установлено, что ингибирование катепсина L снижает экспрессию антиапоптотического белка DCL-2, а активация катепсина L увеличивает экспрессию этого белка и способствует, таким образом, действию каспазы-3. Эти исследователи считают, что катепсин L является важным ферментом, опосредующим злокачественность глиом, и его ингибирование может уменьшать инвазивность глиом и приводить к повышению апоптоза опухолевых клеток путем снижения апоптотического порога [132].

4.3. *Эндогенные ингибиторы цистеиновых протеиназ в процессах канцерогенеза.* Внеклеточную активность лизосомных цистеиновых протеиназ (катепсинов В, L и К), как описано выше, тормозят их эндогенные ингибиторы семейства цистатинов и стефинов [133,134]. Показано, что цистатины могут ограничивать инвазию опухолевых клеток и метастазирование [135-137]. В опытах по трансфекции кДНК цистатина в раковые клетки установлено снижение секретлируемой активности катепсинов L и В, параллельно со снижением инвазивной активности этих клеток, судя по их способности проникать в матригель [137].

Использование различных ингибиторов цистеиновых протеиназ, как эндогенных белковых, так и различных синтетических, способствует выяснению функциональной роли конкретных цистеиновых катепсинов в туморогенезе, инвазии и метастазировании [133]. Синтетические селективные ингибиторы катепсина В значительно снижают инвазию опухолевых клеток молочной железы человека MCF-10AT, полученных при трансфекции онкогеном с-Ha-ras спонтанно иммортализованных клеток MCF-10A, что указывает на активную роль катепсина В в инвазивности клеточных линий рака молочной железы [138]. Кроме того показано, что в стабильно трансфицированных клонах иммунологически полученный антикатепсин L-ScFv сильно ингибирует секрецию прокатепсина L без изменения внутриклеточного количества или процессированных форм катепсина L [139]. Обнаружена колокализация эндогенного катепсина L и антикатепсина L-ScFv. Экспрессия полученного ScFv значительно ингибирует образование опухоли и метастазов клонами меланомы человека у бестимусных

мышей. *In vivo* клетки, трансфицированные антикатепсином L-ScFv, продуцировали опухоли со сниженной васкуляризацией и сопутствующим повышенным апоптозом опухолевых клеток; при этом инвазивность меланомы полностью отсутствовала. Таким образом, впервые продемонстрировано, что антикатепсин L-ScFv можно использовать для ингибирования туморогенности и образования метастатического фенотипа меланомы человека в зависимости от секреции прокатепсина L, а также как молекулярный инструмент для терапии опухолей на клеточном уровне [139].

В последнее время постоянно синтезируют новые ингибиторы лизосомных цистеиновых протеиназ со значительной избирательностью в отношении разных катепсинов. Так, создан новый класс ингибиторов катепсина В, содержащих гетероцикл 1,2,4-тиодиазола с различной распознающей дипептиды последовательностью (то есть, P1'-P2'=Leu-Pro-OH или P2-P1=Cbz-Phe-Ala) в С5 положении и с различными заместителями (то есть, OMe, Phe или COOH) в положении С3 кольца 1,2,4-тиодиазола. Замещенные тиодиазолы (3 a-h) необратимо ингибируют катепсин В. Предполагают, что ингибирование является результатом образования дисульфидной связи между SH-группой цистеина активного центра и атомом серы гетероцикла. Соединение 3a ($K_i = 2,6$ мкМ) с метокси фрагментом С3 и дипептидной распознающей последовательностью Leu-Pro-OH оказалось наиболее мощным ингибитором в этой серии. Кроме того, оно неактивно в отношении катепсина S, является слабым ингибитором катепсина H и более чем в 100 раз избирательно в отношении катепсина В по сравнению с папаином [140]. С другой стороны, создан мощный и селективный ингибитор катепсина S (JNJ10329670), представляющий новый класс иммуносупрессивных соединений [141]. JNJ10329670 является высокоэффективным ($K_i \sim 30$ нМ) непептидным нековалентным ингибитором катепсина S человека. Он значительно менее активен в отношении фермента мыши, собаки, обезьяны и быка. Соединение неактивно в отношении других протеиназ, включая родственные катепсины L, F, и K. Эта избирательность делает JNJ10329670 превосходным инструментом для изучения роли катепсина S в биологических системах человека [141]. В настоящее время предпринимаются попытки использовать имеющиеся данные относительно взаимодействия лизосомных цистеиновых протеиназ и их ингибиторов для разработки антитуморогенных соединений, пригодных для терапевтических целей.

4.4. Клиническое значение определения активности катепсинов в онкологии.

Повышенный уровень ряда катепсинов в биологических жидкостях и тканях больных со злокачественными опухолями сразу же поставил вопрос о возможности использования этого показателя для оценки опухолевого процесса как в отношении предварительной диагностики, так и для оценки эффективности лечения и прогноза заболевания. Сопоставление множества работ в этом плане крайне затруднительно, поскольку изменения в активности того или иного катепсина связаны с характером опухоли и полученные до сих пор данные крайне противоречивы. Однако, некоторые общие положения могут быть сформулированы применительно к конкретным ферментам и определенным видам опухолей. Известно, что наиболее часто у больных с опухолями обнаруживают повышение уровня активности катепсинов В и L [4,5,7]. Так, повышение активности этих катепсинов рассматривается как показатель клинически инвазивных типов менингиом [142]. В этой работе показано, что уровень антигенов катепсинов В и L значительно выше в инвазивных типах доброкачественных менингиом. Катепсин В можно использовать как диагностический признак для отличия гистоморфологически доброкачественной, но инвазивной менингиомы, от гистоморфологически явно доброкачественной опухоли [142]. Сравнение активности катепсинов В и L в цитозоле раковой и нормальной ткани молочной железы позволили сделать заключение, что эти данные являются ценными параметрами в предсказании скорости появления

рецидивов и длительности ремиссии после лечения первичного рака молочной железы [143]. При сравнительном исследовании катепсинов В и L, стефинов А, а также уАП и ингибитора 1 активатора плазминогена (РАI-1) в качестве потенциальных биологических маркеров у больных с карциномой молочной железы выявлена хорошая корреляция между уровнем катепсинов В и L, но лишь умеренная между цистеиновыми и сериновыми протеиназами [144]. В общей группе больных высокие уровни уПА и РАI-1 и низкий уровень стефина В значительно коррелировали с более коротким периодом ремиссии, в то время как такой корреляции не наблюдали для катепсинов В, L и стефина А. У больных с интактными лимфоузлами высокие уровни катепсинов В и L также ассоциировались с более короткой ремиссией, в то время как уПА оставался наиболее значимым из всех этих биологических маркеров. Полагают, что уПА является лучшим прогностическим показателем, чем цистеиновые протеиназы, хотя уровни катепсинов В и L можно использовать для прогноза у больных с раком молочной железы с интактными лимфоузлами [144]. С целью выяснения прогностического значения определения катепсина S исследовали уровни активности этого фермента в паренхиме легкого, ткани опухолей легкого, в лимфоузлах и сыворотке крови больных с раком легкого [145]. Обнаружено увеличение активности катепсина S в ткани опухоли по сравнению с прилегающей тканью. Активность фермента была наиболее высока в лимфоузлах. С точки зрения прогноза заболевания интересно отметить, что у больных с более низким уровнем активности катепсина S в опухолевой и прилегающей тканях наблюдался больший риск летального исхода, чем у больных с более высоким уровнем этого фермента. Катепсин S обнаруживали в опухолевых клетках независимо от их происхождения. Однако, для катепсина S наиболее характерна экспрессия в лимфатической ткани и его считают ключевым ферментом в презентации антигена, опосредованной МНС класса II. Поэтому полагают, что вовлечение катепсина S в опухолевую трансформацию отличается от таковой родственных ему цистеиновых протеиназ катепсинов В и L и скорее ассоциируется с влиянием на иммунный ответ, чем с действием на ВКМ [145]. С другой стороны, исследования роли катепсина S в инвазии астроцитом показали, что фермент экспрессируется в клетках астроцитомы, но полностью отсутствует в нормальных астроцитах, олигодендроцитах, нейронах и эндотелиальных клетках [146]. Опыты на линии клеток U251MGc астроцитомы показали, что скорость инвазии снижается на 61% в присутствии специфического ингибитора катепсина S – 4-морфолин-мочевина-Leu-HomoPhe-винилсульфона. На этом основании считают, что в клетках астроцитомы стимулируется экспрессия катепсина S, которая свидетельствует о возможной потенциальной роли этого фермента в процессе инвазии опухолевых клеток [146]. В контексте вышеизложенного большой интерес представляет только что опубликованный обзор Jedeszko и Sloane, в котором суммированы последние данные относительно изменений в экспрессии, активности и функций цистеиновых катепсинов при прогрессии меланом и опухолей мозга, молочной железы, легкого и простаты человека [147]. Авторы подчеркивают, что изменения в соотношении катепсинов и их эндогенных ингибиторов, цистатинов, является лучшим прогностическим показателем относительно выживания, чем определение уровней только цистеиновых катепсинов или только цистатинов [147].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Представленный материал показывает, что за последние годы значительно расширились и изменились наши представления о цистеиновых лизосомных протеиназах и их биологических функциях в норме и при патологии. Если раньше полагали, что основная функция лизосомных протеиназ – внутриклеточная деградация белков и регуляция их кругооборота, то за последние годы стала ясна их регуляторная функция и участие в определенных физиологических процессах. Открытие новых катепсинов (K, S, F, W и других), экспрессируемых в определенных типах клеток и тканей, а также использование генетических моделей мышей с выключенными генами отдельных катепсинов

позволило выяснить биологическую роль катепсина S и L в процессинге и презентации антигенов, установить роль катепсина K в костной ткани и так далее. Расширились наши знания о роли катепсинов в патологии и, в частности, в процессах канцерогенеза. Сейчас не вызывает сомнений участие этих ферментов и их эндогенных ингибиторов в процессе инвазии, метастазировании и ангиогенезе опухолей. Тем не менее остается много неясных вопросов, в частности, какова роль того или иного катепсина в трансформации и прогрессии отдельных видов опухолей различного гистиогенеза и соответственно их возможного диагностического и прогностического значения. Решение этих вопросов, а также поиски специфических ингибиторов цистеиновых протеиназ в качестве противоопухолевых агентов являются сейчас предметом интенсивных исследований.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Rawlings N.D., Barrett A.J. (1994) *Methods Enzymol.*, **244**, 461-486.
2. Willstatter R., Bamann E., (1929) *Hoppe-Sayler's Z. Physiol. Chem.*, **180**, 127-143.
3. Turk V., Bode W. (1993) In: *Innovations in proteinases and their inhibitors*. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 161-168.
4. McGrath M. (1999) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 181-204.
5. Turk B., Turk D., Turk V. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**, 98-111.
6. Turk V., Turk B., Turk D. (2001) *EMBO J.*, **20**, 4629-4633.
7. Локушина Л.А. (1991) *Вопросы мед. химии*, **37** (6), 15-21.
8. Baicci A., Horler A., Lang A. et al. (1995) *Ann. Rheum. Dis.*, **54**, 281-288.
9. Saftig P., Hunzicker E., Welmeyer O. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 13453-13458.
10. Takeda A., Jimi T., Wakayama Y. et al. (1992) *Biochem. J.*, **288**, 643-648.
11. Cataldo A.M., Nixon R.A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3861-3865.
12. Turk B., Turk V., Turk D. (1997) *Biol. Chem.*, **378**, 141-150.
13. Berti P.J., Storer A.C. (1995) *J. Mol. Biol.*, **246**, 273-283.
14. Karrer K.M., Peiffer S.L., DiTomas M.E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3063-3067.
15. Wex T., Levy B., Bromme D. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **259**, 401-407.
16. Sivaraman J., Nagler D.K., Zhang R., Menard R., Cygler M. (2000) *J. Mol. Biol.*, **295**, 939-951.
17. Chapman H.A., Riese J.P., Shi G-P (1997) *Annu. Rev. Physiol.*, **59**, 63-88.
18. Dolenc I., Turk B., Pungercic G., Ritonja A., Turk V. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 21626-21631.
19. Wiederanders B., Bromme D., Kirschke H., Kalkkinen N. et al. (1991) *FEBS Lett.*, **286**, 189-192.
20. Brocklehurst K., (1994) *Protein Eng.*, **7**, 291-299.
21. Pintiglang S., Watts A.B., Patel M., Raid J. et al. (1997) *Biochemistry*, **36**, 9968-9982.
22. Turk D., Podobnic M., Popovic T., Katanuma N., Bode W., et al. (1995) *Biochemistry*, **34**, 4791-4797.
23. Yamamoto A., Hara T., Tomoo K., Ishida T., Fujii T. et al. (1997) *J. Biochem.*, **121**, 974-977.
24. Otto H.-H., Schirmeister T. (1997) *Chem. Rev.*, **97**, 133-172.
25. Klemencic I., Carmona A.K., Cezari M.N.S. et al. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5404-5412.
26. Musil D., Zucic D., Turk D., Ench R., Mayar L., Huber R. et al. (1991) *EMBO J.*, **10**, 2321-2330.
27. Guncar G., Podobnik M., Pungercar J., Strakelj B., Turk V. et al. (1998) *Structure*, **6**, 51-61.
28. Turk D., Podobnik M., Kuhelj R., Dolinar M. et al. (1996) *FEBS Lett.*, **384**, 211-214.
29. Kominami E., Tsukahara T., Hara K., Katanuma N. (1988) *FEBS Lett.*, **231**, 225-228.
30. Nishimura Y., Kawabata T., Kato K. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**, 64-71.

31. Guozzo J.W., Tao K., Wu Q., Yuong W., et al. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 15611-15619.
32. Tao K., Stearns N.A., Dong J., Wu Q.L., Sahagian G.G. (1994) Arch. Biochem. Biophys., **311**, 19-27.
33. Fox T., de Miguel E., Mort J.S., Storer A.C. (1992) Biochemistry, **31**, 12571-12576.
34. Cygler M., Mort J.S. (1997) Biochimie, **79**, 645-652.
35. Rowan A.D., Mason P., Mach L., Mort J.S. (1992) J. Biol. Chem., **269**, 15993-15999.
36. Podobnic M., Kuhelj R., Turk V., Turk D. (1997) J. Mol. Biol., **271**, 774-788.
37. Cygler M., Siviraman J., Grochulski P., Coulombe R. et al. (1996) Structure, **4**, 405-416.
38. LaLonde J.M., Zhao B., Janson C.A., D'Alessio K.J., M.S. Queney et al. (1999) Biochemistry, **38**, 862-869.
39. Nagler D., Tam W., Storer A.P., Krupa J.C. et al. (1999) Biochemistry, **38**, 4868-4874.
40. Dahl S.W., Halkier T., Lauritzen C., Dolenc I. et al. (2001) Biochemistry, **40**, 1671-1678.
41. Wang B., Shi G.P., Yao P.M., Li Z., Chapman H.A., et al. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 32000-32008.
42. Turk B., Bieth J.G., Bjork I., Dolenc I. et al. (1995) Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **376**, 225-230.
43. Bromme D., Okamoto K., Wang B.B., Biroc S. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 2126-2132.
44. Kirschke H., Wiederanders B., Bromme D., Rinne A. (1989) Biochem. J., **264**, 467-473.
45. Turk B., Dolenc I., Lenarcic B., Krizaj I. et al. (1999) Eur. J. Biochem., **259**, 926-932.
46. Turk V., Bode W. (1991) FEBS Lett., **285**, 213-219.
47. Lenarcic B., Bevec T. (1998) Biol. Chem., **379**, 105-111.
48. Mason R.V. (1989) Arch. Biochem. Biophys., **273**, 367-374.
49. Stubbs M.T., Laber B., Bode W., Huber R. et al. (1990) EMBO J., **9**, 1939-1947.
50. Guncar G., Pungercic G., Klemencic I., Turk V., Turk D. (1999) EMBO J., **18**, 793-803.
51. Bevec T., Stoka V., Pungercic G., Dolenc I., Turk V. (1996) J. Exp. Med., **183**, 1331-1338.
52. Schick C., Pemberton P.A., Shi G.P., Kamachi Y. et al. (1998) Biochemistry, **37**, 5258-5266.
53. Suminami Y., Kishi F., Sekiguchi K., Kato H. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun., **181**, 51-58.
54. Delaria K., Fiorentino L., Wallace P. et al. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 25172-25177.
55. Schick C., Bromme D., Bartuski A.J., Uemura Y. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 13465-13470.
56. Takeda A., Yamamoto T., Nakamura Y., Takahashi T. et al. (1995) FEBS Lett., **359**, 78-80.
57. Chapman H.A., Munger J.S., Shi G.P. (1994) Am. J. Resp. Crit. Care Med., **150**, 155-159.
58. Tezuka K., Tezuka Y., Maejima A., Sato T. et al. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 1106-1109.
59. Linnevers C., Smeekens S.P., Bromme D. (1997) FEBS Lett., **405**, 253-259.
60. Santamaria I., Velasco G., Cazorla M. et al. (1998) Cancer Res., **58**, 1624-1630.
61. Bromme D., Li Z., Barners M., Mehler E. (1999) Biochemistry, **38**, 2377-2385.
62. Slee E.A., Harte M.T., Kluck K.M. et al. (1999) J. Cell Biol., **144**, 281-292.
63. Deussing J., Roth W., Saftig P. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 4516-4521.
64. Nakagawa T.Y., Roth W., Wong P. et al. (1998) Science, **280**, 450-453.
65. Nakagawa T.Y., Brissette W.H., Lira P.D. et al. (1999) Immunity, **10**, 207-217.
66. Gelb B.D., Shi G.P., Chapman H.A. and Desnick R.J. (1996) Science, **273**, 1236-1238.
67. Roth V. (2000) FASEB J., **14**, 2074-2086.
68. Buck M.R., Karustis D.G., Day N.A., Honn K.V., Sloane B.F. (1992) Biochem. J., **282**, 273-278.
69. Authier F., Mort J.S., Bell A.W. et al. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 15798-15807.
70. Pham C.T., Ley T.Y. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 8627-8632.
71. Jutras I., Reudelhuber T.L. (1999) FEBS Lett., **443**, 48-52.
72. Dunn A.D., Grutchfield H.E., Dunn J.T. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 20198-20204.
73. Teppel C., Bromme D., Herzog W. and Brix C. (2000) Cell Sci., **113**, 4487-4498.
74. Felbor U., Dreier L., Bryant R.A. et al. (2000) EMBO J., **19**, 1187-1194.
75. Shi J.G.P., Villadangos J.A., Dranoff G. et al. (1999) Immunity, **10**, 197-206.
76. Riese R., Wolf P., Bromme D. et al. (1996) Immunity, **5**, 357-365.

77. Riese R.J., Mitchell R.N., Villadangos J.A. et al. (1998) J. Clin. Invest., **101**, 2351-2363.
78. Villadangos J.A., Riese R.J., Peters C., Chapman H.A., (1997) J. Exp. Med., **186**, 549-560.
79. Pierre P., Mellman I. (1998) Cell, **93**, 1135-1145.
80. Shi G.P., Bryant R.A., Riese R., Verhelst S. et al. (2000) J. Exp. Med., **191**, 1177-1186.
81. Steller H. (1995) Science, **267**, 1445-1449.
82. Ishisaka R., Kanno T., Akiyama J. et al. (2001) Biochemistry (Tokyo), **129**, 35-41.
83. Li W., Yuan X.M., Nordgren G., Dalen H. et al. (2000) FEBS Lett., **470**, 35-39.
84. Ishisaka R., Utsumi T., Yabuki M., Kanno T. et al. (1998) FEBS Lett., **435**, 233-236.
85. Ishisaka R., Utsumi T., Kanno T., Arita K. et al. (1999) Cell Struct. Funct., **24**, 465-470.
86. Katunuma N., Matsui A., Utsumi K., Qiang L.T. et al. (2000) Adv. Enzyme Regul., **40**, 427-438.
87. Nixon R.A., Cataldo A.M. (1993) Ann. NY Acad. Sci., **679**, 87-109.
88. Pennaechio L.A., Beuley D.M., Higgins K.M. (1998) Nat. Genet., **20**, 251-258.
89. Pham C.T., Thomas D.A., Mercer J.D., Ley T.Y (1998) J. Biol. Chem., **273**, 1629-1633.
90. Schotte P., Van Criekeinghe W., Van de Graen M. et al. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., **251**, 379-387.
91. Vancompernelle K., Van Herreweghe F., Pynaer G. et al. (1998) FEBS Lett., **438**, 150-158.
92. Shibata M., Kanamori S., Isabara K., et al. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., **251**, 199-203.
93. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) Cell, **100**, 57-70.
94. Sloane B.F., Berquin I.M. (1993) In: Proteolysis and Protein Turnover, Portland Press Proceedings, pp. 225-231.
95. Farinati F., Herszenyi L., Plebani M., et al. (1999) Carcinogenesis, **17**, 2581-2587.
96. Fingleton B.M., Heppner-Coss K.J., Crawford H.C. et al. (1999) APMIS, **107**, 102-110.
97. Koblinski J.E., Ahram M., Sloane B.F. (2000) Clin. Chim. Acta, **291**, 113-135.
98. Ishidon K., Kominami E. (1998) Biol. Chem., **379**, 131-135.
99. Frosch B.A., Berquin I., Emmeret-Buck M.R., Moin K., Sloane B.F., (1999) APMIS, **107**, 28-37.
100. Dong J., Prence E.M., Sahagian G.G., (1989) J. Biol. Chem., **264**, 7377-7383.
101. Dilakyan E.A., Zhurbitskaya V.A., Vinokurova S.V. et al. (2001) Clin. Chim. Acta, **309**, 37-43.
102. Sloane B.F., Moin K., Sameni M., et al. (1994) J. Cell Sci., **107**, 373-384.
103. Sameni M., Elliott E., Ziegler G. et al. (1995) Pathol. & Oncol. Res., **1**, 43-53.
104. Podgorski I., Sloane B.F. (2003) Biochem. Soc. Symp., **70**, 263-276.
105. Sloane B.F., Moin K., Lah T. (1994) In: Aspects of the Biochemistry and Molecular Biology of Tumors, Academic Press, San Diego, **2** T, pp. 411-466.
106. Kane S.E., Gottesmann M., (1990) Semin. Cancer Biol., **1**, 127-136.
107. Lloyd J.B., Mason R.W. (Eds) (1996) Biology of the lysosome. Subcellular Biochemistry **27**, Plenum Press New York.
108. Moin K., Day N.A., Sameni M. et al. (1992) Biochem.J., **285**, 427-434.
109. Gong Q., Chan J.S., Baykowski A.S. et al. (1993) DNA Cell Biol., **12**, 299-309.
110. Rescheleit D.K., Rommerskirch W.J., Wiederanders B., (1996) FEBS Lett., **394**, 345-348.
111. Mehtani S., Gong Q., Panella J. et al. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 13236-13244.
112. Donchin A., Suzuki Y.I., Seki H. et al. (2000) Cancer, **36**, 482-487.
113. Kirschke H., Eerola R., Hopsu-Havu V.K. et al. (2000) Eur. J. Cancer, **36**, 787-789.
114. Montcorrier P., Silver I., Farnoud R. et al. (1997) Clin. Exp. Metastasis, **15**, 382-392.
115. Menard R., Carmona E., Takebe S. et al. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 4478-4484.
116. Dalet-Fumeron V., Guinec N., Pagano M. (1993) FEBS Lett., **332**, 251-254.
117. Mason R.W., Massey S.D. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun., **189**, 1659-1666.
118. Guinec N., Dalet-Fumeron V., Pagano M. (1993) Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **374**, 1135-1146.
119. Kobayashi H., Schmitt M., Goretzki L. et al. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 5147-5152.
120. Goretzki L., Schmitt M., Mann K. et al. (1992) FEBS Lett., **297**, 112-118.
121. Eeckhout Y., Vaes G. (1977) Biochem. J., **166**, 21-31.

122. *Murphy G., Stanton H., Cowell S. et al.* (1999) *APMIS*, **107**, 38-44.
123. *Kostoulas R., Lang A., Nagase H., Baici A.* (1999) *FEBS Lett.*, **455**, 280-290.
124. *Poltorac Z., Cohen T., Sivan R. et al.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 7151-7158.
125. *Dhanabal M., Ramchandram R., Waterman M.J.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 11721-11726.
126. *Garnero P., Borei O., Byrjalsen I. et al.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 32347-32352.
127. *McQueney M.S., Amegadzie B.Y., D'Alessio K. et al.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 13955-13960.
128. *Buhlding F., Walburg N., Gerber A. et al.* (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **447**, 281-286.
129. *Littwood-Evans A.J., Bilbe J., Bowler W.B. et al.* (1997) *Cancer Res.*, **57**, 5386-5390.
130. *Krepela E.* (2001) *Neoplasma*, **48**, 332-349.
131. *Gilmore A.P., Streuli C.H.* (1998) *Adhesion and apoptosis*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, pp. 144-165.
132. *Levicar N., Lah T.T., Kos J.* (2003) *Cancer Gene Ther.*, **10**, 141-157.
133. *Kos J., Lah T.T.* (1998) *Oncol. Rep.*, **5**, 1349-1361.
134. *Heideman H.H., Salge U., Abrahamson M. et al.* (1997) *Clin. Exp. Metastasis*, **15**, 368-381.
135. *Boike G., Lah T., Sloane B.F. et al.* (1992) *Melanoma Res.*, **1**, 330-340.
136. *Cox L., Sexton P.S., Green T.J., Darmini N.A.* (1999) *Melanoma Res.*, **9**, 369-374.
137. *Collela R., Cassey S.F.* (2003) *Biotech. Histochem.*, **78**(2), 101-108.
138. *Bervar A., Zajc I., Sever N., Katanuma N.* (2003) *Biol. Chem.*, **384**(3), 447-455.
139. *Rousselet N., Mills L., Jean D. et al.* (2004) *Cancer Res.*, **64**(1), 146-157.
140. *Leung-Toung R., Wadzinska J., Li W. et al.* (2003) *Bioorg. Med. Chem.*, **11**(24), 5529-5537.
141. *Thumond R.L., Sun S., Sehon C.A. et al.* (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**(1), 268-276.
142. *Strojniak T., Zidanic B., Kos J., Lah T.T.* (2001) *Neurosurgery*, **48**, 598-605.
143. *Foekens J.A., Kos J., Peters H.A. et al.* (2002) *Clin. Oncol.*, **16**, 1013-1021.
144. *Levicar N., Kos J., Blejec A. et al.* (2002) *Cancer Detect. Prev.*, **26**, 42-49.
145. *Kos J., Sekirnik A., Kopotar G. et al.* (2001) *Br. J. Cancer*, **85**(8), 1193-1200.
146. *Flannery T., Gibson D., Mirakhur M. et al.* (2003) *Am. J. Pathol.*, **163**(1), 175-182.
147. *Jedeszko Ch., Sloane B.F.* (2004) *Biol. Chem.*, **385**, 1017-1027.

Поступила: 23. 11. 2004

LYSOSOMAL CYSTEINE PROTEINASES AT NEOPLASTIC TRANSFORMATION

E.A. Dilakyan, I.V. Tsvetkova

V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry Rus. Acad. Med. Sci., Pogodinskaya Str., 10,
 Moscow, 119121, Russia
 tel: (095) 246-50-72; fax: (095) 245-08-57;
 e-mail: Inna.Tsvetkova@ibmc.msk.ru

This review summarizes the data on classification, properties, structure and biological functions of mammalian papain-like lysosomal cysteine proteinases (cathepsins). The most studied are cathepsins B, H, L, S and K. The peculiarities of lysosomal cysteine proteinase regulation, particularly regulation by specific endogenous inhibitors are discussed. Involvement of these enzymes in development of physiological and pathological processes are considered. Special attention is paid to the role of cysteine proteinases and their inhibitors in neoplastic transformation. The possibility of use cathepsin endogenous inhibitors as basis for design antitumorogenic therapeutic substances are discussed.

Key words: lysosomal cysteine proteinases, cathepsins, endogenous inhibitors, neoplastic transformation.